

Infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena

Alejandro Cravioto,** Francisca Trujillo,** Luis A. León,** Juan M. Hernández,** Carlos Eslava.**

Resumen

Escherichia coli es una bacteria reconocida como uno de los principales agentes causantes de diarrea en humanos. Las diferentes cepas de esta bacteria en humanos se clasifican en 5 categorías diferentes: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAggEC) y enteropatógena (EPEC). Las cepas del grupo EPEC son responsables de diarrea en niños menores, principalmente de países en desarrollo. El propósito de esta revisión consiste en presentar los conocimientos más recientes relacionados con la patogénesis del grupo EPEC, así como las contribuciones de investigadores mexicanos en el conocimiento del microorganismo.

Palabras clave: *Escherichia coli*, diarrea, EPEC, patogénesis

Summary

Escherichia coli strains currently recognized to cause human diarrhea can be distinguished on the basis of pathogenic mechanism and separated into five categories: enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), enteroaggregative (EAggEC) and enteropathogenic (EPEC). EPEC is a bacterial pathogen that causes diarrhea in infants, particularly in developing countries. The purpose of this review is to summarize recent advances in the understanding of EPEC pathogenesis and the contribution of Mexican investigators to the knowledge of this pathogen.

Key words: *Escherichia coli*, Diarrhea, EPEC, pathogenesis.

*Director de la Facultad de Medicina UNAM.

**Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina UNAM.

Correspondencia y solicitudes de sobreiros al piso, Edif. "B", Facultad de Medicina UNAM, Copilco Universidad, C.P. 04510 Coyoacán, México, D.F.

Antecedentes

Los primeros reportes sobre la capacidad de cepas de *Escherichia coli* para causar diarrea severa en niños, aparecieron en la literatura médica a mediados de los años 40. Bray¹ en Inglaterra y Varela, Aguirre y Carrillo en México,² describieron en forma totalmente independiente, la presencia de cepas de *Escherichia coli* como germen único, en coprocultivos obtenidos de niños pequeños de ambos países con diarreas severas.

La capacidad patogénica de cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en los años 40, se comprobó experimentalmente una de cada después cuando se inocularon oralmente voluntarios con dosis elevadas de bacterias (10⁸ - 10⁹/ml). Su virulencia se demostró por la diarrea que desencadenaron, así como por la respuesta inmunológica sistémica que desarrollaron los voluntarios contra los antígenos somáticos de las cepas con las que fueron desafiados.^{3,4} Neter,⁵ propuso el término de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) para designar a este grupo de bacterias aisladas de niños con diarrea capaces de reproducir el cuadro clínico cuando se administraron a humanos adultos.

Mecanismos de patogenicidad de EPEC

En 1979 Cravioto y cols,⁶ señalaron la capacidad de EPEC para adherirse en forma íntima a células eucariotes en cultivo. Dichos autores encontraron que el 80% de una colección importante de cepas EPEC, formaban microcolonias sobre el citoplasma de células Hep-2, característica que no era compartida por otros grupos de *E. coli* asociados con la producción de diarrea.

En una revisión de necropsias efectuadas en el Hospital Infantil de México,² se encontró que el intestino delgado de niños muertos a consecuencia de diarrea, de cuyas heces se aislaron cepas EPEC, presentaba alteraciones histológicas importantes entre las que predominaba la inflamación aguda de grandes porciones del intestino delgado, así como adelgazamiento de la mucosa intestinal. Investigaciones posteriores, incluyendo estudios con microscopía electrónica, revelaron

que las cepas EPEC se encontraban adheridas a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción importante de las vellosidades intestinales.⁷

Knutton y cols⁸ propusieron que la adherencia al enterocito, de las cepas EPEC, tiene dos fases, una inicial medida por adhesinas de tipo fimbriado que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda fase de adherencia íntima, la cual se relaciona con el esfacelamiento del epitelio, la pérdida de las microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal.

Hasta fecha reciente, no existía confirmación morfológica con relación en la primera fase de adherencia. Giron y cols⁹ encontraron que una cepa EPEC que fue crecida repetidas veces en agar sangre, expresaba haitos de fimbrias parecidos a los que elaboraban *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. La codificación genética para la producción de dichas fimbrias estaba controlada por genes presentes en un plásmido previamente relacionado, tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada, como para causar diarrea en voluntarios humanos.¹⁰

Por otro lado, la fase íntima de adherencia, posterior al esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, se ha relacionado con la expresión de una proteína de 94 kilodaltones (kDa) denominada íntima,¹¹ cuya producción está controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominado *eaeA* y *eaeB*.¹² Para la expresión de este locus se requiere que estén presentes ciertos genes en el plásmido, que poseen información que codifica para la adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas EPEC.

Estudios realizados por Knutton y cols¹³ han señalado que el proceso de adherencia íntima da lugar a que en las células epiteliales se acumule actina, talina y ezrina, lo cual es reflejo de cambios intracelulares importantes. Diversas observaciones han dado lugar para que se proponga, que la alteración ultraestructural observada en las células epiteliales infectadas con cepas EPEC, se debe a la fosforilación de proteínas que conducen a la elevación del calcio intracelular, a través del sistema de la proteína cinasa C, lo cual da lugar a un incremento en la salida de agua, cloro y potasio.^{14,15}

El incremento en la secreción en conjunto con la disminución en la capacidad de absorción del intestino por falta de microvellosidades, propicia la diarrea secretora aguda y quizá la persistencia del padecimiento en algunos de los casos. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades, con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, ha sido denominado adherencia y esfecelamiento (A/E).^{16,17} Los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se hayan podido evidenciar in vitro mediante un sistema de marcaje fluorescente (sistema de faloidina actina fluorescente [FAS]), que ha permitido medir los acúmulos de actina polimerizada asociados con lesiones de adherencia y esfecelamiento.¹⁵

Desde tiempo atrás se ha propuesto que cepas del grupo EPEC poseen la capacidad para invadir las células del epitelio intestinal. Estudios histopatológicos de tejidos animales y de biopsias de humanos infectados con cepas EPEC, han demostrado que las bacterias se encuentran intracelularmente.^{18,19} Donnenberg y cols (20,21) han utilizado un modelo de invasividad in vitro, empleando cultivos de células Hep-2 con gentamicina, la metodología sin embargo, ha sido cuestionada. En un estudio realizado en el laboratorio para conocer la capacidad de adherencia, el daño en el citoesqueleto medido por la prueba FAS y la propiedad de invasividad, empleando el método propuesto por Donnenberg, de diferentes cepas de EPEC (manuscrito en preparación), se encontró que sólo 2 de 22 de estas cepas resultaron invasivas, sin que ninguna de ellas diera la prueba de Senrey positiva. En este mismo estudio se encontró que cepas no pertenecientes a los serogrupos EPEC, pero con patrón de adherencia localizada eran invasivas apoyando lo planteado por Riley y cols,²² quienes señalan que la formación de agregados bacterianos protege a las bacterias de la acción de la gentamicina, por lo cual, al quedar las bacterias adheridas a la superficie celular, es difícil distinguir aquellas que se puedan encontrar internalizadas, de las que sólo se encuentran adheridas en la superficie.

Mecanismos de transmisión de EPEC

El ingreso de estos microorganismos al nuevo huésped se realiza por vía oral, y el desarrollo o no de un cuadro clínico va a depender de los mecanismos de defensa constitutivos del cuerpo, de los relativos a la inmunidad, de la dosis del inóculo y de los factores de patogenicidad de la bacteria. Ha sido observado que tanto el personal de salud encargado del cuidado de los niños en cuneros, como los miembros de la familia, pueden excretar los serotipos EPEC involucrados en brotes epidémicos sin haber presentado manifestaciones clínicas.

En el ambiente hospitalario se considera que es posible la transmisión del microorganismo por polvo y/o fomites. En virtud de la asociación de sintomatología respiratoria observada en casos de diarrea, cuya etiología se ha relacionado con cepas EPEC, se plantea que esta vía pueda tener un papel importante en la transmisión del microorganismo.

Recientemente, en el laboratorio, se ha realizado la tipificación serológica de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de aire y suelo intra y extradomiciliario (manuscrito en preparación). Los resultados obtenidos mostraron en un total de 113 aislamientos, 32 cepas pertenecientes a diferentes serogrupos EPEC, 32 a ETEC, 1 a EIEC y 3 a EHEC, lo cual confirma la posibilidad de que las corrientes de aire jueguen un papel importante en la transmisión de microorganismos del grupo EPEC.

Los casos de diarrea por cepas de EPEC en cuneros de países industrializados son muy poco frecuentes en la actualidad;²³ por el contrario, en los países en desarrollo, la prevalencia de diarrea por EPEC sigue siendo muy alta, en especial durante los primeros 6 meses de vida.²⁴

La época del año probablemente no influye importantemente sobre las tasas de incidencia, pues hay reportes contradictorios al respecto, no obstante, se considera que su mayor frecuencia puede ser durante el verano.

En un estudio realizado por Cravioto y cols²⁵ sobre el riesgo de diarrea durante el primer año de vida asociado con colonización inicial y subsecuentemente por enteropatógenos específicos, se en-

contró que 34 de 53 niños colonizados por EPEC (64%) presentaron diarrea, con una duración promedio de 8 días, acompañada de fiebre en el 63% y vómito en el 48% de los casos. Los cuadros más severos se observaron en niños menores de 6 meses, dos de los cuales requirieron hospitalización e hidratación parenteral, sin embargo, no hubo ninguna defunción asociada a diarrea en este estudio, así mismo, los niños mayores de 6 meses fueron tratados exitosamente únicamente a base de hidratación oral. En el mismo estudio destacó el hecho de que 8 de los 53 niños antes referidos se infectaron con un germen similar durante el primer año de vida, pero sólo 2 de ellos presentaron nuevamente un cuadro diarreico. Este hecho y la distribución por edades que tiene la infección causada por EPEC, sugiere el desarrollo de inmunidad protectora, aunque falta precisión en cuanto a la naturaleza de la misma.

Inmunidad en cepas EPEC.

La inmunidad natural desempeña un importante papel en la protección contra las infecciones por *Escherichia coli*. En lo que respecta a la de tipo pasivo, es importante destacar que en las comunidades en las que perdura la alimentación al seno materno como forma prioritaria o única de alimentación infantil, la incidencia de diarrea es baja en comparación con aquellas en las que se ha sustituido esta por el uso de fórmulas, esto probablemente esta asociado a los riesgos de contaminación fecal que conlleva la preparación de la leche y el manejo de biberones.

Al analizar la capacidad protectora del calostro y de la leche materna contra infecciones intestinales producidas por cepas EPEC,^{27,28} se observó una respuesta específica de IgA secretora en ambos productos de muestras obtenidas de mujeres mexicanas, contra la adhesina de 94 kDa producida por las cepas de EPEC. Al realizar un ensayo de neutralización en la prueba de adherencia en células Hep-2, empleando la misma IgA se observó que ésta se inhibía. Al analizar las muestras de leche de estas mujeres se encontró que contienen pentasacáridos y moléculas de lactosa con dos

residuos de fucosa, los cuales también inhiben la adherencia localizada de cepas EPEC.

Vacunas

Con el conocimiento de la respuesta específica de componentes del calostro y la leche en conjunto, y con los antecedentes relacionados a la protección contra la infección por EPEC en niños alimentados al seno materno, es que se ha iniciado el desarrollo de una vacuna que pueda ser útil para el control de la diarrea asociada a infección por dicho microorganismo. En un reporte previo (28) utilizando una cepa O111:H2 se obtuvieron mutantes espontáneas y otras a las que se les indujo la mutación en el gen *galE*, con lo cual se obtuvieron cepas deficientes en la producción de galactosauridín 5' difosfato epimerasa. Dichas mutantes conservan la capacidad para adherirse en forma localizada pero no llegaban a producir la lesión de adherencia y esfacelamiento en el intestino de conejos. Estudios posteriores en voluntarios 29, inoculados con grandes dosis de dichos mutantes, confirmaron la capacidad de ésta para colonizar el intestino de dichos individuos durante un período de 10 días, medido por la identificación de la bacteria en las heces de los voluntarios durante este tiempo. Al evaluar la respuesta inmune de los individuos se encontró que tenían anticuerpos tanto contra el antígeno "O" de la bacteria con la que fueron desafiados como contra la proteína de 94-kDa relacionada con la adherencia íntima de la bacteria. La posibilidad de incrementar selectivamente la presencia de anticuerpos específicos en la leche materna contra cepas EPEC o sus adhesinas, por medio de la inoculación oral a mujeres embarazadas con las mutantes del tipo antes descrito, abre una opción más segura para la protección específica contra la diarrea de niños pequeños.

Referencias

1. Bray J. Isolation of antigenically homozygous strains of *Bacterium coli*, Neapolitanum from Summer Diarrhea of infants. J Path Bact 1945;57:239-47.

2. Varela G, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia coli*-gomez nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med Hosp Infant Mex 1946;3:3-7.
3. June RC, Ferguson WW, Warfel MT. Experiments in feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 55:B5, a coliform organism associated with infant diarrhea. Amer J Hyg 1953;57:222-36.
4. Koya G, Kosakaini, Fukawara Y. Supplementary studies on the multiplication of *Escherichia coli*-B4 in the intestinal tract of adult volunteers and its relation to manifestations of coli-enteritis. Jpn J Med Sci Biol 1954;7:655-61
5. Neter E, Webb CR, Schumway CN. *Escherichia coli* D433: occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity sensitivity to antibiotics. Proc Soc Exp Biol Med 1950;75:504-07.
6. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 1979;3:95-9.
7. Rothbaum R, Mc Adams AJ, Giannella R, Partin JL. A clinico-pathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrheal infants. Gastroenterology 1982;83:441-54.
8. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun 1987;55:69-77.
9. Giron JA, Ho ASY, Schoolnick GK. An Inducible Bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science 1991;254:710-13.
10. Levine MM, Nataro JP, Karch H, et al. The diarrheal response of human to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J Infect Dis 1985;152:550-59.
11. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, et al. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J Infect Dis 1985;152:560-565.
12. Jerse AE, Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94 kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. Infect Immun 1991;59:4302-09.
13. Knutton-S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1989;57:1290-98.
14. Baldwin TJ, Brooks SF, Knutton S. Protein phosphorylation by protein kinase C in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1991;59:761-71.
15. Knutton S, Phillips AD, Smith HR, et al. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent actin staining test. Infect Immun 1991;59:365-71.
16. Jerse AE, YU J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7839-43.
17. Jerse Ae, Gicquelais KG, Kaper JB. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect Immun 1991;59:3869-75.
18. Andrade JRC, Santa Rosa RM. Attachment and intracellular penetration of classic enteropathogenic *Escherichia coli* into Hep-2 cells. Rev Microbiol 1986;17:53-7.
19. Rothbaum RJ, Partin JC, Saalfeld K, and MacAdams AJ. An Ultrastructural Study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in humans infants. Ultrastruct Pathol 1983;4:291-304.
20. Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Epithelial invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with me EPEC adherence factor. J Infect Dis 1989;160:452-59.
21. Donnenberg MS, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. A comparison of Hep-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 1990;57:83-6.
22. Riley LW, Junio LN, Schoolnick GK. Hela invasion by a strain of enteropathogenic *Escherichia coli* that lacks the O-antigen polysaccharide. Mol Microbiol 1990;4:1661-66.
23. Levine MM, Levine OS. Changes in human emlogy and behavior in relation to the emergence of diarrheal diseases, including cholera. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:2390-4.
24. Benenson AS. (DE) El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Publicación Científica No. 538. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud. 1992. pp.97-106.
25. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De la Roca JM, Henández JM, Pérez G, Vazquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol 1990;131:886-904.
26. Cravioto A. Presencia de factores específicos en leche materna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos. Gac Méd Mex 1990;128:35-42.
27. Cravioto A, Tello A, Villafan F, Ruiz J, DEL Vedoso S, Neesser JR. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. J Infect Dis 1991;163:1247-55.
28. Cravioto A. Prospecto para la elaboración de una vacuna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos. Bol Med Hosp Infant Mex 1984;41:122-28.
29. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Tello A, Vázquez V. Oral vaccination of human volunteers with *galE* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Cell function and disease, Cañedo L, Todd L, Packer L (de). New York Plenum Publishing Company, 1989. pp 275-80.